

BAB III METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi yaitu seluruh bagian yang berguna sebagai target di suatu penelitian. Populasi dari penelitian ini yaitu ekstrak etanol daun kacang tujuh jurai (*Phaseolus lunatus* L) yang diperoleh di Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah.

Sampel merupakan salah satu bagian dari populasi dan dipakai pada suatu penelitian. Sampel dari penelitian ini yaitu daun kacang tujuh jurai (*Phaseolus lunatus* L) yang masih segar dengan ciri daun berwarna hijau, belum berubah warna dan tidak busuk yang diambil secara acak.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi Variabel Utama

Variabel utama pertama dari penelitian ini yaitu krim ekstrak etanol daun kacang tujuh jurai (*Phaseolus lunatus* L) dengan variasi konsentrasi. Variabel utama kedua dari penelitian ini yaitu aktivitas antiinflamasi krim ekstrak etanol daun kacang tujuh jurai (*Phaseolus lunatus* L).

2. Klasifikasi Variabel Utama

Klasifikasi variabel utama dibagi menjadi variabel bebas, variabel tergantung dan variabel kendali.

Variabel bebas, yaitu variabel yang telah direncanakan untuk diamati pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dari penelitian ini yaitu basis krim (Krim m/a) dengan variasi konsentrasi.

Variabel tergantung, merupakan variabel yang dapat dipengaruhi oleh variabel bebas. Variabel tergantung dari penelitian ini yaitu sifat fisik sediaan krim, stabilitas sediaan dan % reduksi edema.

Variabel terkontrol, merupakan variabel yang berpengaruh terhadap variabel tergantung maka harus ditentukan kualifikasinya agar diperoleh hasil yang terdistribusi merata dan mampu diulangi oleh peneliti. Variabel terkontrol dari penelitian ini yaitu hewan uji, kecepatan pengadukan, suhu pemanasan dan kondisi laboratorium.

3. Definisi Operasional Variabel Utama

Pertama, daun kacang tujuh jurai yaitu daun segar berwarna hijau didapatkan dari Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah.

Kedua, serbuk daun kacang tujuh jurai yaitu serbuk simplisia daun kacang tujuh jurai diayak menggunakan ayakan no 40.

Ketiga, ekstrak etanol daun kacang tujuh jurai yaitu ekstrak etanol 70% serbuk kering diekstraksi dengan metode maserasi.

Keempat, variasi krim ekstrak etanol daun kacang tujuh jurai adalah variasi konsentrasi dalam pembuatan krim ekstrak (10%, 15% dan 20%).

Kelima, sifat fisik krim yaitu parameter untuk mengetahui mutu fisik dari sediaan krim tipe m/a yang telah dibuat (homogenitas, organoleptis, daya sebar, daya lekat, uji ph, viskositas, tipe krim, uji stabilitas).

Keenam aktivitas antiinflamasi adalah kemampuan krim ekstrak etanol daun kacang tujuh jurai terhadap inflamasi punggung tikus berdasarkan tebal edema yang diukur menggunakan jangka sorong digital.

Ketujuh edema yaitu inflamasi buatan yang muncul setelah dilakukan induksi karagenan secara subkutan.

Kedelapan karagenan adalah induktor nyeri diberikan secara subkutan pada kulit punggung tikus.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang diperlukan pada penelitian ini yaitu blender, ayakan nomor 40, neraca analitik, botol maserasi, corong, rotary evaporator, beaker glass, gelas ukur, cawan porselin, batang pengaduk, viscotester Rion VT-O4, mortir, stamfer, ph meter, kertas saring, kain flanel, *water bath*, spuit, tabung reaksi, jangka sorong digital, vial, oven, pot krim, gunting, kandang hewan uji, dan komputer.

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain ekstrak etanol daun kacang tujuh jurai, vaselin alba, paraffin liquid, asam asetat, TEA, nipagin, nipasol, Oleum Rosae, Aqua destilata, Veet®, Krim Hidrokortison, Biocream, Karagenan, larutan Nacl 0,9% etanol 70%, tikus putih jantan galur wistar umur 2-3 bulan memiliki bobot 150-200g.

D. Formulasi

Tabel 1. Formulasi Krim

Bahan	Konsentrasi (% b/v)		
	Formula 1	Formula 2	Formula 3
Ekstrak daun kacang tujuh jurai	10	15	20
vaselin	20	20	20
Paraffin cair	10	10	10
Asam stearat	10	10	10
TEA	2	2	2
Nipagin	0,3	0,3	0,3
Nipasol	0,3	0,3	0,3
Oleum rosae	qs	qs	qs
Aquadest	Ad 100 ml	Ad 100 ml	Ad 100 ml

(Elmitra *et al.*, 2018)

E. Jalannya Penelitian

1. Determinasi Tanaman

Determinasi tumbuhan bertujuan untuk menentukan kebenaran sampel uji berdasarkan ciri morfologi dari tanaman kemudian dicocokkan dengan kunci determinasi yang dibuktikan pada Laboratorium Biologi Universitas Setia Budi, Surakarta.

2. Pembuatan Serbuk Daun Kacang Tujuh Jurai

Daun kacang tujuh jurai yang didapatkan dari Tawangmangu selanjutnya dilakukan sortasi basah untuk menghilangkan bagian tanaman yang tidak digunakan, lalu dilakukan dibersihkan menggunakan air mengalir untuk mengeliminasi pengotor yang menempel pada bahan awal. Daun kacang tujuh jurai yang telah bersih diletakkan di atas loyang yang terbuat dari alumunium kemudian dijemur di bawah sinar matahari dan ditutup dengan kain hitam. Simplisia yang sudah kering selanjutnya dihaluskan dan diayak menggunakan ayakan no 40.

3. Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Kacang Tujuh Jurai

Ekstrak etanol daun kacang tujuh jurai dibuat dengan cara maserasi menggunakan solvent etanol 70% dengan ratio 1:10. Serbuk daun kacang tujuh jurai diambil 1000 g di masukkan pada bejana maserasi lalu direndam etanol 70% sebanyak 10 L. Maserasi dibiarkan selama 6 jam pertama dengan sesekali penggojokan, dan disimpan pada tempat yang terlindung dari sinar matahari selama 18 jam. Setelah 24 jam, maserat disaring dan di tampung filtratnya, kemudian dilakukan proses remaserasi dengan menggunakan sekurang-kurangnya dengan setengah pelarut pertama. Seluruh filtrat hasil penyaringan di tampung kemudian diuapkan untuk diperoleh ekstrak kental menggunakan rotary evaporator

pada suhu 50°C (Kemenkes, 2013). Hitung persen rendemen ekstrak yang diperoleh menggunakan rumus di bawah ini :

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{bobot ekstrak yang didapat}}{\text{bobot serbuk simplisia yang diekstraksi}} \times 100\%$$

4. Identifikasi Kandungan Kimia Daun Kacang Tujuh Jurai

Identifikasi kandungan kimia dimaksudkan untuk menetapkan kebenaran kandungan kimia flavonoid, saponin, polifenol, triterpenoid dan alkaloid yang terkandung dalam ekstrak daun kacang tujuh jurai (*Phaseolus lunatus* L.) yang dibuktikan di Laboratorium Fitokimia Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta. Identifikasi kandungan kimia ekstrak daun kacang tujuh jurai (*Phaseolus lunatus* L.) adalah sebagai berikut :

4.1. Identifikasi flavonoid. Metode yang digunakan untuk identifikasi flavonoid adalah uji sianidin/shibata atau juga sering disebut dengan uji willstatter. Uji dilakukan dengan cara mengambil 5 ml ekstrak dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan serbuk magnesium, asam hidroklorida pekat dan amil alkohol. Campuran dikocok dengan kuat dan dibiarkan memisah. Hasil positif flavonoid ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah, kuning atau jingga pada lapisan amil alkohol (Karisma, 2016).

4.2. Identifikasi saponin. Untuk mengidentifikasi adanya senyawa alkaloid dilakukan dengan cara mengambil ekstrak sebanyak 2 ml pada cawan penguap, kemudian di uapkan di atas di *water bath* sampai diperoleh residu. Residu yang diperoleh kemudian dilarutkan dengan 5 ml asam klorida 2 N. Larutan yang diperoleh kemudian dibagi ke dalam 3 tabung reaksi. Tabung pertama ditambahkan dengan asam klorida encer yang berfungsi sebagai blanko. Tabung kedua ditambahkan 3 tetes pereaksi dragendorff dan tabung ketiga ditambahkan 3 tetes pereaksi mayer. Terbentuknya endapan berwarna jingga pada tabung kedua dan endapan kuning pada tabung ketiga menunjukkan adanya alkaloid (Farnsworth, 1966).

4.3. Pengujian fenolik. Diambil sebanyak 1 mL larutan ekstrak dengan konsentrasi 1000 µg/mL dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan 2 tetes larutan FeCl₃ 5%. Sampel mengandung fenolik ditunjukkan dengan terbentuknya warna hijau atau biru yang kuat.

5. Pengujian Kadar Air

Penetapan kadar air pada ekstrak daun kacang tujuh jurai (*Phaseolus lunatus* L.) menggunakan alat *Sterling-Bidwell*. Ekstrak

ditimbang 5 gram dan masukan dalam labu alas bulat Sterling-Bidwell setelah itu tambahkan pelarut toluen 50 ml kemudian panaskan hingga tetes air habis. Kemudian volume tetesan dihitung dan dilihat kadarnya dalam satuan % v/b (Kemenkes, 2011).

6. Pembuatan Basis Krim

Timbang seluruh bahan, memanaskan mortir di atas *water bath*. Meleburkan vaselin album, paraffin cair, asam stearat dan nipasol dalam cawan penguap di atas *water bath* pada suhu 70-75°C aduk *ad* homogen (fase minyak). Campurkan nipagin, TEA dan air (fase air). Masukkan fase minyak pada mortir panas kemudian ditambahkan fase air secara perlahan-lahan aduk *ad* homogen dan terbentuk massa krim. Masukkan ekstrak kental pada mortir panas, kemudian ditambahkan basis krim sedikit demi sedikit dan aduk *ad* homogen lalu tambahkan ekstrak daun kacang tujuh jurai ke dalam krim dan terakhir teteskan oleum rosae qs.

7. Uji Mutu Fisik Krim

Pengujian krim meliputi uji organoleptik di antaranya bentuk (tekstur), warna dan bau, uji pH, uji homogenitas, uji daya sebar, uji daya lekat, dan uji stabilitas juga dilakukan.

7.1. Pengamatan organoleptis. Merupakan pemeriksaan yang dilakukan menggunakan panca indera seperti bau, warna, dan tekstur pada krim yang telah dibuat. Pemeriksaan organoleptis krim dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali pada masing-masing variasi konsentrasi krim yang telah dibuat (Dirjen POM, 1979).

7.2. Pemeriksaan homogenitas. Pengujian homogenitas dilakukan untuk mengetahui ketercampuran dari bahan-bahan yang diformulasikan. Pengujian dilakukan dengan menimbang 1 g krim kemudian digoreskan pada plat kaca transparan. Mengamati ada atau tidaknya butiran dan gumpalan pada krim (Ida dan Noer, 2012). Pemeriksaan homogenitas krim dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali pada masing-masing variasi konsentrasi krim yang telah dibuat.

7.3. Pengukuran pH. Pemeriksaan pH digunakan untuk memastikan nilai pH krim yang dibuat telah sesuai dengan pH kulit yakni 4.5 – 6.5. PH diukur dengan pH meter. Kalibrasi pH meter dilakukan dengan cara mencelupkan elektroda pada dua larutan dapar sehingga pH larutan uji diharapkan terletak di antaranya biasanya digunakan dapar standar pH 4 dan pH 7. PH sediaan hair tonic disesuaikan dengan pH kulit kepala, yaitu berkisar pH 4,5-6,5. Jika terlalu asam maka akan

menyebabkan iritasi kulit. Jika terlalu basa akan menyebabkan gatal-gatal dan kulit bersisik (Lestari, 2016).

7.4. Daya lekat. Pemeriksaan dilakukan dengan mengambil 0.5 g krim digoreskan pada plat kaca kemudian diletakan pembarat 250 g selama 5 menit. Catat waktu hingga kedua plat kaca terlepas. Krim memiliki daya lekat yang baik bila diperoleh ≥ 4 detik (Ulaen *et al.*, 2012; Parwanto *et al.*, 2013; Edy *et al.*, 2016). Pemeriksaan pH krim dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali pada masing-masing variasi konsentrasi krim yang telah dibuat.

7.5. Daya sebar. Timbang 0,5 gram krim, lalu letakkan di tengah cawan petri dengan posisi terbalik, didiamkan selama 1 menit dan diberi beban 50 gram sampai 250 gram setiap 1 menit 5. Standar daya sebar krim yaitu 5 cm – 7 cm (Ulaen *et al.*, 2012; Parwanto *et al.*, 2013; Edy *et al.*, 2016). Pengujian dilakukan dengan replikasi tiga kali untuk masing-masing formula.

7.6. Uji viskositas krim. Menimbang 25 g krim memasukannya dalam wadah kemudian diukur menggunakan viscotester Rion VT-O4. Viscotester dinyalakan, nilai viskositas sediaan diperoleh bila jarum menunjukkan pengukuran konstan dan stabil.

7.7. Uji tipe emulsi. Uji tipe emulsi dilakukan dengan beberapa metode yaitu :

7.7.1. Metode pewarnaan. Krim yang telah dibuat kemudian dimasukkan pada beaker glass, ditambahkan dengan pewarna metilen biru kemudian diamati. Bila terjadi penyebaran warna ke semua emulsi maka dinyatakan sebagai krim tipe M/A (Rhadia dan Fitriyanti, 2015).

7.7.2. Metode pengenceran. Sediaan yang telah dibuat kemudian diletakkan pada vial diencerkan menggunakan air yang. Bila emulsi bisa terencerkan maka dinyatakan sebagai krim tipe M/A (Rhadia dan Fitriyanti, 2015).

7.7.3. Metode daya hantaran listrik. Krim yang sudah dibuat dimasukan ke dalam beaker glass kemudian hubungkan ke arus listrik lampu yang berpijar menandakan tipe krim adalah krim M/A (Rhadia dan Fitriyanti, 2015).

7.8. Uji stabilitas krim. Uji stabilitas dilakukan dengan *metode cycling test*, yaitu sampel disimpan pada suhu $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ selama 24 jam, kemudian sampel dipindahkan untuk disimpan dengan suhu 40°C selama 24 jam, hal ini dihitung sebagai 1 siklus. Lakukan sebanyak 6 siklus dan evaluasi mutu fisik sediaan krim ekstrak daun kacang tujuh jurai.

8. Pembuatan Larutan Karagenan

Pengujian antiinflamasi menggunakan penginduksi larutan karagenan 3% (300 mg karagenan didispersikan menggunakan NaCl fisiologis (0,9%) hingga volume 10 mL sehingga akan diperoleh larutan karagenan 3 % (b/v)). Larutan karagenan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam sebelum disuntikkan (Dewanti *et al.*, 2016).

9. Uji Antiinflamasi

Tikus dibagi menjadi 5 kelompok, masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor tikus. Kelompok 1 untuk pengujian krim ekstrak daun kacang tujuh jurai dengan konsentrasi 5%, kelompok 2 untuk pengujian krim ekstrak daun ekstrak daun kacang tujuh jurai dengan konsentrasi 10%, kelompok 3 untuk pengujian krim ekstrak daun kacang tujuh jurai dengan konsentrasi 15%, kelompok 4 untuk pengujian kontrol positif (Krim Hidrokortison 2,5%), dan kelompok 5 untuk pengujian kontrol negatif (Biocream). Masing-masing tikus dicukur bulunya secukupnya dibagian punggung kemudian Masing-masing tikus dari tiap kelompok dicukur bulu punggungnya kurang lebih 3 cm dan diberikan Veet® agar tidak tersisa bulu pada punggung tikus, kemudian tikus diperlakukan sesuai kelompoknya.

Tabel 2. Perlakuan Uji Antiinflamasi

Kelompok	Perlakuan
I	Krim ekstrak etanol daun kacang tujuh jurai 10%
II	Krim ekstrak etanol daun kacang tujuh jurai 15%
III	Krim ekstrak etanol daun kacang tujuh jurai 20%
IV	Kontrol positif Krim Hidrokortison 2,5%
V	Kontrol negatif basis krim

Satu jam setelah perlakuan kemudian diinjeksikan larutan karagenan 3% pada punggung tikus dengan volume 0,2 mL. Punggung tikus diukur menggunakan jangka sorong setiap 30 menit selama 6 jam setelah induksi karagenan.

10. Persentase Daya Anti Inflamasi

Pemeriksaan aktivitas antiinflamasi dengan mengamati timbulnya edema pada kulit punggung hewan uji. Kemudian dilakukan pengukuran terhadap luas area menggunakan jangka sorong dan dapat dihitung menggunakan rumus:

$$Cu = Ct - C_0$$

Keterangan :

Cu = tebal edema kulit punggung tikus tiap waktu (t)

C_t = tebal edema kulit punggung tikus setelah diinduksi karagenan 3% pada waktu (t)

C_0 = volume edema kulit punggung tikus sebelum diinduksi karagenan 3%

Data tebal edema tiap jam selanjutnya dibuat kurva perbandingan antara volume edema dibanding waktu. Selanjutnya mencari nilai AUC (area under the curve) yang merupakan luas daerah rata-rata di bawah kurva yang menunjukkan hubungan tebal edema rata-rata tiap satuan waktu, menggunakan rumus di bawah ini:

$$AUC_{n-1}^n = \frac{C_{n-1} + C_n}{2} (t_n - t_{n-1})$$

Keterangan:

C_{n-1} = tebal edema rata-rata pada t_{n-1}

C_n = tebal rata-rata pada t_n

Persentase daya antiinflamasi kemudian dihitung menggunakan rumus

$$PI (\%) = \frac{AUC_k - AUC_p}{AUC_k} \times 100\%$$

Keterangan:

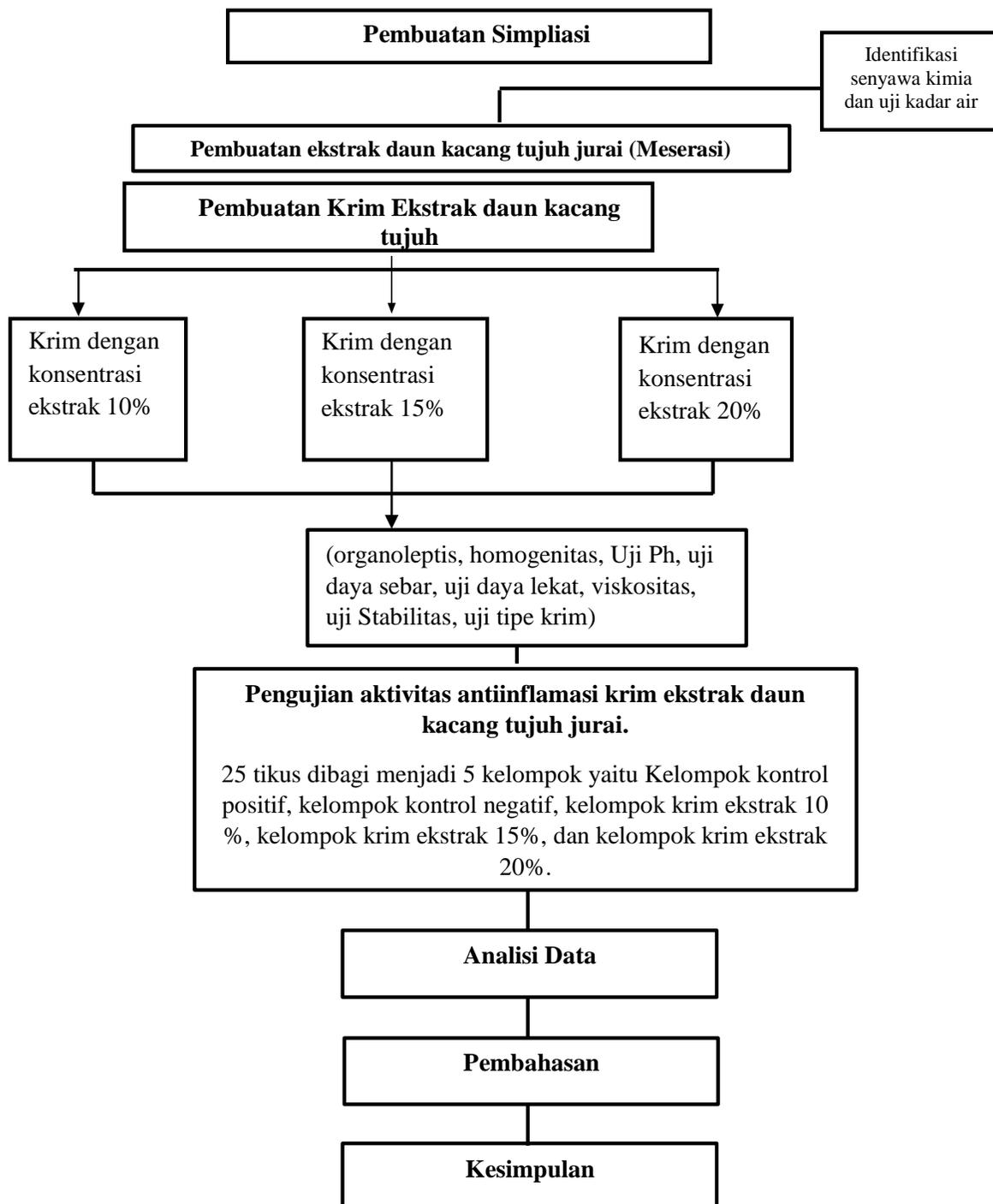
AUC_k = AUC total pada kontrol negatif (mm.jam)

AUC_p = AUC total pada kelompok yang diberi senyawa uji (mm.jam) (Wahyudi 2019).

F. Analisis Hasil

Analisis hasil dari data yang diperoleh secara statistik menggunakan program SPSS. Persen daya antiinflamasi tiap kelompok uji dianalisis dengan uji Shapiro-Wilk untuk mengetahui distribusi data. Apabila terdistribusi normal $p > 0,05$ maka analisis dilanjutkan secara parametrik dengan One way ANOVA dengan taraf kepercayaan 95%, namun bila data tidak terdistribusi normal $p < 0,05$ maka analisis dilanjutkan secara non parametrik Kruskal-Wallis. Bila hasil menunjukkan terdapat perbedaan $p < 0,05$ maka digunakan analisis lanjutan dengan analisis Post hoc Mann-Whitney (Dahlan, 2014).

G. Skema Penelitian



Gambar 5. Skema Penelitian